

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
25 août 2005 (25.08.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2005/078101 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C12N 15/29, C07K 14/415, C12N 15/82, A01H 5/00

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2005/050060

(22) Date de dépôt international :  
31 janvier 2005 (31.01.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0450199 3 février 2004 (03.02.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université,  
F-75338 Paris Cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :  
PRATELLI, Réjane [FR/FR]; Lotissement de Vi-  
aiguemaux, F-73350 Bozel (FR). HOSY, Eric [FR/FR];  
7, Allée de la Sorgues, F-13140 Miramas (FR). LA-  
COMBE, Benoît [FR/FR]; 2420, avenue de Toulouse,  
F-34070 Montpellier (FR). ROMIEU, Charles [FR/FR];  
8, rue de la Grimaudière, F-34830 Jacou (FR). TORRE-  
GROSA, Laurent [FR/FR]; 15, cité de l'Enclos, F-11200

Luc/Orbieu (FR). THIBAUD, Jean-Baptiste [FR/FR];  
10, rue du général Maureilhan, F-34000 Montpellier (FR).  
SENTENAC, Hervé [FR/FR]; 51, rue Michel-Ange Les  
Ormeaux Bat N, F-34070 Montpellier (FR).

(74) Mandataire : CAMUS, Olivier; 8, place du Ponceau,  
F-95000 Cergy (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,  
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,  
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,  
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,  
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: USE OF GENES ENCODING OUTWARD POTASSIUM CHANNELS FOR MODIFYING AT LEAST ONE PHENO-  
TYPE LINKED TO THE SIZE AND ORGANIC ACID CONTENT OF AT LEAST ONE PLANT STORAGE ORGAN

(54) Titre : UTILISATION DE GÈNES CODANT DES CANAUX POTASSIQUES SORTANTS POUR MODIFIER UN PHÉNO-  
TYPE RELATIF À UNE TAILLE D'AU MOINS UN ORGANE DE STOCKAGE D'UNE PLANTE ET À LA TENEUR DE CET  
ORGANE EN ACIDES ORGANIQUES

(57) Abstract: The invention relates to the use of a gene encoding a new outward potassium channel of *Vitis vinifera* for modifying  
at least one phenotype linked to the size and organic acid composition of grape berries. The gene is used to increase the size of the  
berries and the tartaric acid build-up therein. For this purpose, for example, the gene product is overexpressed by transgenesis. The  
invention also relates to a label comprising a nucleotide sequence encoding a polypeptide sequence that is at least 40 % identical to  
a polypeptide sequence deduced from gene VvSOR (SEQ ID NO 1). The label enables genes to be identified in other plant species,  
which genes code for new potassium channels identical to the grape berry potassium channel in order to modify the size and/or  
organic acid composition of plant storage organs.

(57) Abrégé : L'invention concerne une utilisation d'un gène codant un nouveau canal potassique sortant de *Vitis vinifera* pour mo-  
difier un phénotype relatif à une taille et à la composition en acides organiques de baies de raisins. Ce gène est utilisé de manière  
à augmenter la taille de telles baies et la quantité d'acide tartrique accumulée dans celles-ci. Pour ce faire, il est par exemple prévu  
de surexprimer le produit du gène par transgénèse. L'invention concerne également un marqueur comportant une séquence nucléoti-  
dique codant une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite du gène  
VvSOR (SEQ ID N°1). Ce marqueur permet d'identifier des gènes dans d'autres espèces de plantes, ces gènes codant pour des nou-  
veaux canaux potassiques similaires au canal potassique de baies de raisins en vue de modifier également la taille et/ou la composition  
en acides organiques d'organes de stockage de plantes.

WO 2005/078101 A2



— avec la partie réservée au listage des séquences de la description publiée séparément sous forme électronique et disponible sur demande auprès du Bureau international

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

Utilisation de gènes codant des canaux potassiques sortants pour modifier un phénotype relatif à une taille d'au moins un organe de stockage d'une plante et à la teneur de cet organe en acides organiques

5

*Domaine technique*

La présente invention se rapporte à une amélioration des qualités agronomiques d'une plante, en vue de l'obtention de caractéristiques améliorées pour l'industrie, tout particulièrement pour les industries agro-alimentaires, par exemple, la production de baies de raisins de différentes tailles présentant des teneurs en acides organiques (dont l'acide tartrique) améliorées. Plus précisément, la présente invention vise à modifier une taille des organes de stockage tels que les fruits, et à améliorer la quantité, teneur ou la composition en acides organiques de ces organes par le même procédé.

*Etat de la technique*

20 1) Taille des organes de stockage.

Une plante cultivée présente généralement une tige et au moins un organe de stockage. Par tige on entend une partie axiale de la plante qui s'élève au dessus du sol, croît en sens inverse des racines et porte les feuilles et l'organe de stockage. On entend par organe de stockage, tout organe susceptible d'être consommé par un être vivant, comme par exemple une graine, un fruit charnu ou oléagineux, mais aussi des légumes ou des tubercules comme la pomme de terre. L'organe de stockage est relié temporairement à au moins une des extrémités de la tige. Ainsi, la sève élaborée transite depuis la tige vers les organes de stockage.

30 Il est connu des espèces de plantes qui naturellement forment des organes de stockage présentant des phénotypes "petite taille" ou "grande taille" par rapport à une taille d'un organe de stockage de référence de cette même espèce. On entend par taille de référence d'un organe de stockage, une taille moyenne d'organes de stockage calculée à partir d'un échantillon donné d'organes de stockage "sauvage" d'une même espèce.

## 2

Pour des raisons de commodité de production, transformation ou consommation, il peut être intéressant de modifier la taille des organes de stockage pour augmenter ou diminuer leur volume. Par exemple, en augmentant le volume des organes de stockage pour obtenir des organes de  
5 stockage présentant un phénotype grande taille, on peut éviter d'augmenter le nombre de tiges de plantes à cultiver dans un champs. Ou inversement, en diminuant le volume d'organes de stockage pour obtenir des organes de stockage présentant un phénotype petite taille, on peut par exemple répondre à une attente des consommateurs souhaitant ingérer de tels  
10 organes de stockage miniaturisés en peu de bouchées. Notamment, il est connu que l'on peut d'obtenir des tomates de gros volumes qui sont particulièrement adaptées pour une préparation culinaire de tomates farcies. Ou bien, il est également connu d'obtenir des tomates de faibles tailles ou plus communément appelées "tomates cerises" que l'on a l'habitude de  
15 consommer en apéritif.

## 2) Composition en acides organiques

L'augmentation de la masse, associée à une augmentation de la taille, d'un organe végétal implique généralement l'accumulation d'une quantité plus  
20 importante d'eau et d'éléments minéraux et organiques (et inversement pour une diminution de la taille).

Parmi les éléments minéraux dont le niveau d'accumulation est susceptible d'être modifié parallèlement à la masse d'un organe végétal se trouve le potassium qui est très généralement l'ion minéral en plus grande abondance  
25 dans les cellules vivantes.

Parmi les éléments organiques solubles qui se trouvent accumulés dans les cellules en accompagnement du potassium, on trouve très généralement les acides organiques. En effet, les acides organiques sont les principales espèces chimiques participant à la neutralisation de la charge positive  
30 apportée par le potassium accumulé dans les cellules.

Ainsi, la manipulation du niveau d'accumulation de potassium dans un organe végétal est susceptible d'être accompagnée non seulement d'une variation de la masse de cet organe mais également de l'accumulation des acides organiques dans ce même organe.

35 Les acides organiques, produits par le métabolisme cellulaire, déterminent

l'acidité du contenu cellulaire. Cette acidité dont l'importance est extrêmement variable d'un type cellulaire à l'autre, d'un tissu à l'autre et d'une espèce à l'autre, est souvent un facteur organoleptique voire technologique important dont la maîtrise est recherchée dès lors que telle ou telle partie d'une plante est destinée à l'alimentation, animale ou humaine, que ce soit à l'état brut, par exemple, recherche de fruits plus ou moins acides, ou après un procédé quelconque de transformation, comme par exemple, s'agissant de la vigne, l'ensemble des procédés visant à obtenir du vin à partir de baies de raisin.

Le principal acide organique qui se trouve accumulé dans les cellules des plantes est fréquemment l'acide malique, mais d'autres acides organiques peuvent, selon l'espèce de plante ou l'organe, se trouver accumulés en quantités notables.

Dans le cas de la baie de raisin, un autre acide organique majeur est l'acide tartrique. L'accumulation d'acide tartrique est un phénomène relativement rare dans le règne végétal et la vigne est à cet égard une des exceptions remarquables en tant qu'espèce d'intérêt agro-économique majeur. L'acide tartrique est très peu dégradé dans les cellules vivantes ce qui fait que la quantité synthétisée à un stade donné du développement reste durablement accumulée dans les cellules.

Ainsi, au cours du développement de la baie de raisin, l'acide tartrique et l'acide malique sont les deux principaux acides organiques accumulés dans les cellules et par conséquent les deux principaux contributeurs de l'acidité du moût puis du vin obtenus après la vendange. Après la fermentation alcoolique produite par les levures, l'acide malique présent dans le moût est sujet à une fermentation bactérienne et se trouve en part plus ou moins importante dégradé en acide lactique. Cette fermentation malo-lactique, qui transforme un acide double en acide simple, se traduit par une baisse d'acidité significative du moût. Cette baisse d'acidité est d'autant plus importante que l'acide malique est présent en quantité importante et se trouve prédominant par rapport à l'acide tartrique qui n'est l'objet d'aucune fermentation bactérienne. Après la fermentation malo-lactique, le rôle de l'acide tartrique dans la détermination de l'acidité du vin est donc essentiel.

De cet ensemble de faits bien connus des œnologues, il résulte qu'un rapport tartrate/malate élevé dans les baies au moment de la récolte est un

facteur extrêmement positif et donc recherché.

*Problème technique*

- 5 Actuellement, il est difficile de jouer sur la taille des organes de stockage. Par exemple, pour augmenter la taille des organes de stockage en vue d'obtenir un meilleur rendement, on utilise généralement des engrais. De tels engrais sont choisis de manière à répondre aux besoins nutritionnels de la plante et à compenser les éventuelles carences nutritives du sol. Par exemple, les
- 10 engrais fournissent des éléments indispensables à la fabrication de protéines et constituants cellulaires pour la plante.
- Cependant, l'engrais peut être un produit néfaste pour l'environnement. L'ajout d'engrais entraîne notamment des pollutions du sol et des nappes phréatiques. L'évacuation des nitrates dans le sol pose des problèmes
- 15 d'environnement difficiles à résoudre. De plus, il est nécessaire de rajouter régulièrement de l'engrais du fait que les éléments nutritifs contenus dans cet engrais s'épuisent au cours de la consommation par la plante.
- En outre, pour diminuer la taille des organes de stockage, des générations de croisement de plantes peuvent être nécessaires pour sélectionner la taille
- 20 que l'on souhaite. Enfin, il peut arriver que le phénotype "petite taille" ou "grande taille" ne soit pas stable d'une génération à une autre..
- De plus, une modification de la taille ne doit pas se traduire par une dégradation de la qualité organoleptique de l'organe de stockage, par exemple de l'acidité du fruit.
- 25 Il est donc souhaitable de trouver des solutions permettant de préserver ou d'augmenter des paramètres de qualité organoleptique et/ou nutritionnelle tout en modifiant la taille de l'organe de stockage.
- L'invention résout ce problème en mettant en œuvre un procédé pouvant agir sur ces deux paramètres, de manière indépendante ou simultanée. Pour
- 30 cela, le procédé selon l'invention est basé sur le contrôle des mécanismes d'accumulation du potassium dans l'organe.
- En effet, comme expliqué ci-dessus, une modification de la teneur en potassium d'un organe de stockage est susceptible d'influencer à la fois la croissance dudit organe et donc sa taille finale, et la teneur et composition
- 35 relative en acides organiques dudit organe.

La présente invention a donc pour objet, par la mise en œuvre des mêmes procédés, la modification non seulement de la taille d'un organe de stockage d'une plante mais également la modification de la quantité d'acides organiques accumulés dans cet organe. Il est possible de modifier  
5 uniquement la taille d'un organe de stockage ou la quantité d'acides organiques. Il est également possible de modifier parallèlement la taille d'un organe de stockage et la quantité d'acides organiques accumulés dans ledit organe de stockage.

Il existe une grande variété d'acides organiques présents dans les cellules  
10 d'une plante et la présente invention peut par conséquent avoir comme application une modification non seulement de la quantité totale d'acides organiques accumulés dans l'organe visé, mais également de la répartition de l'acidité organique totale entre les différentes sortes d'acides organiques. Les procédés selon la présente invention peuvent modifier de manière  
15 significative la quantité d'acides organiques accumulés dans un organe de stockage d'une plante. Notamment, les procédés selon la présente invention peuvent permettre de modifier le rapport de la quantité d'acide tartrique accumulée dans les organes de stockage sur la quantité d'acide malique accumulée dans lesdits organes de stockage. Selon des exemples de mises  
20 en œuvre des procédés selon l'invention, la quantité d'acide tartrique peut être augmentée ou diminuée.

Un des buts de l'invention est donc de pouvoir jouer sur la taille et/ou la composition en acides organiques des organes de stockage, selon les besoins de l'utilisateur, sans les inconvénients liés par exemple à des  
25 apports d'engrais cités ci-dessus.

#### *Solutions apportées par l'invention*

30 Les inventeurs ont découvert que durant le développement de la baie de la vigne *Vitis vinifera*, le potassium était fortement et constamment accumulé dans l'exocarpe et dans les cellules du tissu vasculaire liant le pédicelle à la baie. A l'inverse, les inventeurs ont observé que durant ce même développement, la concentration de potassium dans les cellules de la baie  
35 tend à diminuer.

De telles observations ont conduit les inventeurs à s'intéresser plus spécifiquement à identifier un système de transport transmembranaire d'ions potassium chez la plante *Vitis Vinifera*. A partir de gènes déjà identifiés chez *Arabidopsis* codant pour des canaux potassiques sortant de type Shaker, les  
5 inventeurs ont pu identifier un gène VvSOR chez *Vitis Vinifera* qui code pour un nouveau canal potassique sortant similaire à un canal potassique sortant déjà isolé chez *Arabidopsis*.

Au cours des diverses expériences, les inventeurs ont découvert qu'en surexprimant ce gène dans la vigne, la taille des baies était augmentée.  
10 D'autre part, la sur-expression de ce gène peut également provoquer une forte augmentation de la quantité d'un acide organique, tel que l'acide tartrique, produit et accumulé dans la baie. Ainsi, le gène VvSOR code pour un canal potassique sortant impliqué dans la croissance des baies de raisin et déterminant l'accumulation d'acide tartrique dans la baie, qui constitue un  
15 élément de la qualité organoleptique et nutritionnelle de la baie, en particulier pour ce qui concerne la transformation de la baie en vin et les qualités organoleptiques du vin qui en découlent.

Par l'intermédiaire de ce gène VvSOR, un autre but de l'invention est de détecter dans un grand nombre d'espèces de plantes, un gène similaire  
20 codant pour un canal potassique sortant. Ce gène similaire peut alors être utilisé à la fois pour moduler la croissance des organes de stockage de chacune des espèces pour lesquelles on a pu isoler le gène d'intérêt. Ce gène similaire peut également être utilisé pour modifier les teneurs de ces organes en certains acides organiques, de manière indépendante ou  
25 simultanée.

#### *Sommaire de l'invention*

L'invention a donc pour objet premier un procédé pour l'obtention d'une plante transformée en fonction d'un phénotype relatif à une taille d'un organe  
30 de stockage de la plante ou la composition en acides organiques de cet organe, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape suivante :

- modifier dans les cellules de l'organe de stockage ou dans les tissus qui alimentent l'organe de stockage l'expression d'un gène codant pour un canal potassique sortant.

35 L'invention a trait également à un procédé de sélection d'une plante en



fonction d'un phénotype relatif à la taille d'un organe de stockage de la plante ou la composition en acides organiques de cet organe, caractérisé en ce qu'on mesure l'expression d'un gène codant pour un canal potassique sortant dans les cellules des organes de stockage ou dans les tissus alimentant les organes de stockage.

5

L'invention concerne une cellule d'une plante, caractérisée en ce qu'elle surexprime un gène codant pour un canal potassique sortant, dont une séquence polypeptidique présente au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1.

10 L'invention concerne également une plante, caractérisée en ce qu'elle surexprime un gène codant pour un canal potassique sortant, dont une séquence polypeptidique présente au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N°1.

L'invention a aussi pour objet une utilisation d'un gène codant pour un canal potassique sortant pour modifier dans une plante un phénotype relatif à une taille d'au moins un organe de stockage ou la composition en acides organiques de cet organe.

15

L'invention a aussi pour objet un anticorps, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre tout ou partie d'un polypeptide issu de l'expression d'un gène codant un canal potassique sortant.

20

L'invention a pour objet un procédé de détection d'une présence de tout ou partie d'un polypeptide issu de l'expression d'un gène codant pour un canal potassique sortant dans un échantillon contenant un mélange de polypeptides, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

25 - mettre en contact l'échantillon avec l'anticorps précédemment décrit, et

- détecter un complexe antigène/anticorps formé.

Et enfin, l'invention a pour objet un kit de détection de tout ou partie d'une séquence polypeptidique issue d'un gène codant un canal potassique, caractérisé en ce qu'il comprend l'anticorps précédemment décrit.

30

### *Description détaillée*

L'un des buts de l'invention est de permettre l'obtention de manière sûre d'au moins une plante dont le phénotype relatif à la taille d'un organe de stockage

35

et/ou la composition en acides organiques de cet organe sont modifiés. Pour cela, l'invention a pour objet un procédé dont l'une des étapes consiste à modifier dans les cellules de l'organe de stockage ou les tissus qui l'alimentent, une expression d'un gène codant pour un canal potassique sortant.

5 Comme précédemment mentionné, on entend par plante un organisme végétal comportant une tige et au moins un organe de stockage, la tige étant destinée à supporter temporairement cet organe de stockage. Par tige on entend une partie axiale de la plante qui s'élève au dessus du sol, croît en sens inverse des racines et porte les feuilles et les organes de stockage. On entend par organe de stockage, tout organe susceptible d'être consommé par un être vivant, comme par exemple un fruit charnu, un fruit oléagineux, des graines mais aussi des légumes ou des tubercules comme la pomme de terre. L'organe de stockage est relié temporairement à au moins une des extrémités de la tige. Ainsi, la sève élaborée transite depuis la tige vers les organes de stockage.

15 On entend par "gène" une séquence ordonnée de nucléotides qui occupe une position précise sur un chromosome déterminé et qui constitue une information génétique dont la transmission est héréditaire. Les gènes correspondent à une portion d'une molécule d'ADN. Ils possèdent la capacité de se répliquer. Les gènes représentent les unités physiques et fonctionnelles élémentaires de l'hérédité. L'ensemble des gènes d'un organisme constitue son génome.

25 Les termes "acides nucléiques", "polynucléotides", "oligonucléotides" ou encore "séquences nucléotidiques" englobent les séquences d'ARN, d'ADN, d'ADNc ou encore des séquences hybrides ARN/ADN de plus d'un nucléotide, indifféremment sous la forme simple brin ou sous la forme de duplex.

30 Le terme "nucléotide" désigne à la fois des nucléotides naturels (A, T, G, C) ainsi que des nucléotides modifiés qui comprennent au moins une modification telle qu'un analogue d'une purine, un analogue d'une pyrimidine, ou un sucre analogue.

Aux fins de la présente invention, un premier polynucléotide est considéré comme étant "complémentaire" d'un second polynucléotide lorsque chaque base du premier nucléotide est appariée à la base

complémentaire du second polynucléotide dont l'orientation est inversée. Les bases complémentaires sont A et T (ou A et U), et C et G.

La modification de l'expression d'un gène dans la cellule végétale peut s'effectuer par transgénèse végétale. La transgénèse est une transformation  
5 de la cellule végétale qui peut être réalisée par les techniques connues de l'homme du métier. Plus particulièrement, on entend par transgénèse un ensemble d'opérations permettant d'obtenir des organismes transgéniques, c'est-à-dire dont un patrimoine génétique a été modifié. On entend par  
10 patrimoine génétique l'ensemble des séquences nucléotidiques contenu dans au moins une cellule d'un organisme vivant. Le patrimoine peut être modifié par l'introduction dans la cellule d'une cassette d'expression obtenue par génie génétique et comportant un gène exogène ou gène étranger. Par cassette d'expression on entend une séquence nucléotidique codant au moins pour des signaux de début et de fin de transcription. Par gène  
15 exogène on entend un gène issu d'une manipulation génétique visant ou non à modifier un gène en particulier dans la cellule. Dans l'invention, ce gène particulier est la séquence SEQ ID N°1 ou une séquence codant une séquence polypeptidique comportant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N° 1. Introduit dans  
20 cette cassette d'expression, le gène exogène sera transcrit en ARN messager dans la cellule, grâce aux signaux propres de la cassette.

L'introduction du gène étranger dans la cellule peut être réalisée directement par microinjection directe de ce gène étranger dans des  
embryoïdes de plante, par infiltration sous vide, par électroporation, par  
25 précipitation directe au moyen de polyéthylène glycol (PEG) ou par bombardement par canon de particules recouvertes de l'ADN plasmidique d'intérêt.

On peut également transférer l'ADN étranger en infectant la plante par une souche bactérienne, notamment d'*Agrobacterium*.

30 De nombreux procédés de l'état de la technique peuvent être aisément mis en œuvre par l'homme du métier afin d'obtenir des plantes ou des cellules transformées par un gène codant un canal potassique, selon l'invention.

Ces techniques de transferts de l'ADN visent soit à activer une expression  
35 d'un gène dans la cellule (ou gène cellulaire) ou à inactiver cette même

expression. L'activation du gène cellulaire peut s'effectuer soit en insérant plusieurs copies du même gène (ou gène étranger) dans un génome cellulaire, ou en plaçant la séquence codante du transgène sous le contrôle d'un promoteur dit fort (c'est-à-dire conduisant à un fort niveau d'expression),  
5 ou bien en insérant une seule copie du gène et un facteur de transcription puissant du gène. L'inactivation du gène cellulaire peut par exemple se faire en insérant un gène étranger dont l'ARNm est complémentaire de l'ARNm du gène d'intérêt. Ainsi, les deux ARNm d'origine cellulaire et étranger s'hybrident et aucune protéine ne peut être produite.

- 10 Selon un exemple particulier de l'invention, le procédé d'obtention de plantes dont le phénotype relatif à la taille et/ou la composition en acides organiques des organes de stockage est modifié peut être réalisé en transformant au moins une cellule de la plante d'intérêt avec un gène codant pour un canal potassique sortant. Puis, les cellules transformées sont sélectionnées. Puis,  
15 une plante transformée est régénérée à partir des cellules transformées. La cellule à transformer peut être choisie parmi des cellules d'une plante pouvant reproduire un organisme entier.

- Selon un exemple particulier de l'invention, le gène dont l'expression est modifiée code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de  
20 similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1.

- On entend par séquence polypeptidique un enchaînement d'acides aminés. Le pourcentage de similarité entre deux séquences de nucléotides ou d'acides aminés, au sens de la présente invention, peut être déterminé en  
25 comparant deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison.

- La partie de la séquence nucléotidique ou polypeptidique dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des substitutions par rapport à la séquence de référence de manière à obtenir un alignement optimal des  
30 deux séquences.

- Le pourcentage de similarité se calcule entre deux séquences polypeptidiques. Ce pourcentage de similarité est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles deux résidus d'acide aminé se correspondent dans un alignement tout en appartenant à une même famille physico-chimique d'acides aminés, puis en divisant ce nombre par le nombre total de  
35

positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par cent pour obtenir le pourcentage de similarité.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus.

5 De manière préférée, le pourcentage de similarité de séquences est déterminé à l'aide du logiciel BLAST (version BLAST 2.06 de Septembre 1998), en utilisant exclusivement les paramètres par défaut.

La séquence SEQ ID N°1 correspond à un ADNc codant un nouveau canal potassique sortant de *Vitis Vinifera* et qui a été détecté par  
10 l'intermédiaire de deux gènes codant pour des canaux potassiques similaires chez *Arabidopsis thaliana*.

En dessous de 40% de similarité de séquence polypeptidique, la séquence polypeptidique identifiée chez une espèce de plante donnée risque de ne pas correspondre à un gène codant un canal potassique similaire au  
15 canal potassique sortant codé par le gène SEQ ID N°1. Une telle séquence prélevée peut ne pas correspondre à un gène susceptible d'intervenir dans la modification du phénotype relatif à la taille ou de la composition en acides organiques d'organes de stockage. Alors qu'on peut obtenir dans chacune des espèces de plantes donnée un gène codant une séquence  
20 polypeptidique comprenant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite du gène de la SEQ ID N°1 codant un canal potassique sortant chez *Vitis Vinifera*. Par exemple, on pourra identifier une séquence nucléotidique codant une séquence polypeptidique comportant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la  
25 séquence SEQ ID N°1 chez la pomme de terre ou chez le riz, et utiliser un tel gène pour modifier le phénotype relatif à la taille ou la composition en acides organiques d'organes de stockage de ces deux plantes ou d'autres espèces de plantes.

Selon un procédé de réalisation préféré de l'invention, on choisit de modifier  
30 l'expression du gène du canal potassique sortant de manière à augmenter la taille de l'organe de stockage. Mais, on pourrait également choisir de diminuer la taille des organes de stockage. Pour augmenter la taille d'un organe de stockage selon l'invention, on choisit de surexprimer le gène codant le canal potassique précédemment décrit. En effet, les inventeurs ont  
35 découvert qu'en surexprimant le gène VvSOR dans la cellule de baie de

raisins de *Vitis vinifera* tout en transférant au moins une copie supplémentaire du gène d'intérêt dans la cellule par transgénése, la taille de la baie était 1,7 fois plus importante que la taille de référence d'une baie de raisins "sauvage". On entend par taille de référence d'une baie de raisin

5 "sauvage", une taille moyenne calculée à partir de la taille de l'ensemble des baies de raisins contenues dans un échantillon représentatif prélevé sur un cultivar de *Vitis Vinifera* "sauvage" correspondant, n'ayant subi aucune transformation génétique, selon l'invention.

Par les mêmes expériences, les inventeurs ont découvert que la

10 surexpression du gène VvSOR provoque une augmentation importante, jusqu'à 20%, de la quantité d'acide tartrique produite et accumulée dans les baies.

Pour la présente invention, les inventeurs ont augmenté l'expression du gène d'intérêt impliqué dans la croissance des organes de stockage. Pour ce faire,

15 ils ont cloné un ADN complémentaire VvSOR (ou ADNc VvSOR) ou SEQ ID N°1 issu de la vigne *Vitis vinifera* dans un vecteur CAMV 35S pour obtenir un vecteur recombinant. Des cellules embryogéniques de la vigne *Vitis* ont été ensuite transformées avec ce vecteur recombinant pour insérer dans le génome de ces cellules au moins une copie supplémentaire du gène. La

20 cellule à transformer peut être choisie parmi les cellules d'une plante pouvant reproduire un organisme entier. Cette technique a été plus particulièrement décrite dans le document Torregrosa, L. (1998) *Vitis* 37, 91-92.

On utilise alors le gène codant une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec la séquence polypeptidique déduite de la

25 séquence du gène SEQ ID N°1 pour augmenter l'expression de la protéine correspondante dans les cellules de chaque espèce de plante dont on veut modifier la taille de l'organe de stockage et/ou modifier la composition en acides organiques.

Selon l'invention, on obtient alors une cellule transformée par le procédé d'obtention ci-dessus décrit.

30

Selon l'invention également, on obtient une plante transformée par le procédé d'obtention et par la cellule transformée ci-dessus décrit.

L'invention prévoit également un marqueur d'un gène intervenant dans un phénotype relatif à une taille ou la composition en acides organiques d'un

35 organe de stockage. Le marqueur comprend une séquence nucléotidique

codant une séquence polypeptidique ayant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de tout ou partie de la séquence nucléique SEQ ID N°1 ou tout ou partie d'une séquence nucléotidique complémentaire de SEQ ID N°1, ou d'une séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3. Ce pourcentage de similarité prend en compte les différences existant d'une espèce de plante à une autre tout en assurant que le gène code pour un canal potassique impliqué dans le phénotype taille ou composition en acides organiques d'organe de stockage ou ayant un comportement similaire au canal potassique issu de l'expression du gène SEQ ID N°1.

Ce marqueur peut être utilisé pour détecter des plantes dans lesquelles est exprimé un gène codant une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléique SEQ ID N°1. Ces plantes pour lesquelles on a pu identifier le gène similaire au gène de la SEQ ID N°1 peuvent alors être modifiées selon l'invention par l'intermédiaire de ce gène détecté.

Ce marqueur peut être détecté par hybridation moléculaire entre la séquence nucléotidique d'un marqueur d'une plante donnée et tout ou partie de la séquence SEQ ID 1, de la séquence complémentaire de SEQ ID N°1 ou de la séquence SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3.

La séquence nucléotidique du marqueur peut être sous une forme d'un d'ADNc, d'un brin d'ADN non codant ou d'un ARNm. La séquence nucléotidique du marqueur peut être sous toute forme susceptible d'être détectée par hybridation moléculaire avec tout ou partie de la séquence SEQ ID N°1, de la séquence complémentaire SEQ ID N°1 ou de la SEQ ID N°2 ou de la séquence SEQ ID N°3.

Les séquences nucléotidiques SEQ ID N°2 et SEQ ID N°3 forment respectivement une amorce avant et une amorce arrière de la SEQ ID N°1. Ces amorces permettent de détecter une présence du gène SEQ ID N°1 via une hybridation de l'ADNc, de l'ADN non codant, ou de l'ARNm issu du gène SEQ ID N°1. Ces amorces correspondent à des séquences nucléotidiques flanquant le gène de la séquence SEQ ID N°1.

L'invention concerne également une amorce nucléotidique qui comprend une séquence nucléotidique codant une séquence polypeptidique ayant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de tout ou

partie des séquences nucléotidiques SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3. Ces séquences SEQ ID N°2 et SEQ ID N°3 correspondent respectivement à une séquence flanquante avant et à une séquence flanquante arrière de la SEQ ID N°1. Ces amorces peuvent servir pour réaliser une RNA-PCR, technique  
5 bien connue de l'homme du métier. Cette technique permet d'amplifier le gène d'intérêt pour ensuite l'utiliser afin de modifier l'expression d'un gène codant un canal potassique d'une plante selon l'invention.

Pour sélectionner des plantes ou des cellules de plantes relativement à un phénotype "taille" ou à la composition en acides organiques des  
10 organes de stockages desdites plantes, l'invention prévoit que l'on mesure l'expression d'un gène codant pour un canal potassique sortant dans les cellules des organes de stockage ou les tissus qui alimentent cet organe. L'invention prévoit que le gène dont on mesure l'expression code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec la  
15 séquence polypeptidique déduite du gène défini par la séquence SEQ ID N°1.

Pour mesurer l'expression du gène d'intérêt, on peut réaliser selon l'invention soit une mesure d'une quantité d'ARNm issu d'une transcription du gène codant pour le canal potassique, soit une mesure d'une quantité de protéines  
20 résultant de l'expression de ce gène. La mesure de ces quantités peut être réalisée par des techniques de biologie moléculaire bien connues de l'homme du métier. Par exemple la mesure de ces quantités peut être réalisée par une technique d'hybridation moléculaire (Northern Blot), une technique de reverse-PCR quantitative ou par une technique de Western  
25 Blot.

Les inventeurs ont découvert que l'expression du gène VvSOR correspondant à la SEQ ID N°1 est particulièrement observable dans les cellules des parties aériennes de la plante *Vitis vinifera* et dans les organes de stockage de cette même plante.

30 Les inventeurs ont découvert que le gène VvSOR code une protéine comportant 796 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 91,2 kDa. La protéine comporte une structure typique des canaux Shaker des plantes (voir figure 1). Cette protéine comporte une région N-terminale, un cœur hydrophobe composé de 6 segments transmembranaires (dénommés  
35 S1 à S6) et un pore formant un domaine (P) entre S5 et S6, une longue



- région C-terminale contenant un site supposé être un site de liaison de nucléotide cyclique, suivi par un domaine ankyrine consistant en 6 motifs répétés, suivi d'un domaine K<sub>HA</sub> (Zimmermann, S. et Sentenac, H. (1999) Current Opinion in Plant Biology 2, 477-482), riche en acides aminés hydrophobe et acides. L'ensemble des régions C et N terminales des canaux de plante de type Shaker est supposé être de localisation cytoplasmique.
- 5 Le développement des baies de raisins est caractérisé en une première phase de croissance, une phase intermédiaire de stagnation suivie d'une transition appelée véraison puis d'une deuxième phase de croissance.
- 10 Notamment, les inventeurs ont découvert que la quantité d'ARNm issu de l'expression du gène SEQ IDN°1 était particulièrement importante au cours du développement de la baie et que la quantité de protéines était particulièrement importante au moment du développement et après le développement de la baie.
- 15 Les mesures de l'expression du gène d'intérêt peuvent donc s'effectuer préférentiellement à des moments particuliers de développement de la plante. Dans un exemple particulier de réalisation de l'invention, on préféra choisir le moment du développement de l'organe de stockage pour prélever des cellules et mesurer leur taux d'ARNm ou pour mesurer le taux de
- 20 protéines exprimé par le gène d'intérêt dans une cellule transformée.
- En réalisant le procédé de sélection sur des cellules d'un organe de stockage ... à un moment du développement, il est avantageusement possible d'identifier les plantes ayant des organes de stockage de grosse taille du fait spécifiquement de la surexpression du gène et non du fait d'un
- 25 ensoleillement ou d'une alimentation particulièrement propice. Par ce fait, les plantes ainsi identifiées ont de grandes chances de produire de manière stable et reproductible de nouvelles générations de plantes ayant également cette caractéristique génétique.
- Ainsi, on évite de sélectionner des plantes non transformées qui
- 30 posséderaient par exemple un facteur de transcription puissant devant le gène SOR présent dans les plantes de références.
- Il est également possible de sélectionner les plantes transformées par l'intermédiaire d'un antibiotique. En effet, au cours de la transformation de cellules d'organes de stockage, on peut prévoir que le vecteur recombinant
- 35 comporte un gène de résistance à un antibiotique en plus du gène d'intérêt.

Par ailleurs cette méthode peut être une méthode de vérification et être utilisée pour vérifier que les plantes ont bien été transformées.

Préalablement à l'étape de mesure de l'expression du gène, on peut sélectionner des plantes dont les organes de stockage ont une taille au moins supérieure de 25% en masse par rapport à une taille de référence d'organes de stockage.

On entend par taille de référence d'organes de stockage, une taille moyenne calculée à partir d'une mesure de l'ensemble d'organes de stockage issu d'un échantillon d'organes de stockage sauvage, c'est à dire qui n'ont pas été transformée et qui sont représentatifs de l'espèce et de la variété, lignée ou cultivar considérés. On obtient ainsi une taille de référence pour chaque variété, lignée ou cultivar d'une espèce de plante considérée.

Par exemple, la taille d'un organe de stockage peut être quantifiée en mesurant le poids de 100 organes de stockage pour une espèce sauvage donnée. On obtient alors un poids de référence d'organes de stockage pour une plante donnée non transformée. Parallèlement, on mesure le poids de 100 autres organes de stockage d'une plante qui a été modifiée selon l'invention. Puis on compare ces deux poids pour en déduire une éventuelle transformation de la plante. Dans un exemple, les inventeurs ont découverts que le poids d'un organe de stockage issu d'une plante transformée selon l'invention était 1,7 fois plus important que le poids d'un organe de stockage issu d'une plante non transformées.

L'invention concerne également une utilisation d'un gène codant pour un canal potassique sortant pour modifier un phénotype relatif à une taille ou la composition en acides organiques des organes de stockage d'une plante. Le gène code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec la séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléotidique SEQ ID N°.1. Ce gène est utilisé dans l'invention en modifiant son expression. Notamment, dans un exemple préféré de l'invention, on a choisi de surexprimer le gène dans des cellules de l'organe de stockage pour augmenter la taille des organes de stockage. Mais on pourrait choisir également d'inhiber son expression pour diminuer la taille des organes de stockage. Ce gène permet d'identifier les plantes comportant un gène dont l'expression permet d'obtenir un canal potassique ayant des propriétés physiologiques similaires au canal potassique de VvSOR.

L'invention concerne également un anticorps dirigé contre tout ou partie d'une séquence polypeptidique issue de l'expression d'un gène, laquelle séquence polypeptidique présente au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1.

- 5 On entend par anticorps au sens de la présente invention des anticorps polyclonaux ou monoclonaux ou des fragments (par exemple les fragments F(ab)'2, F(ab) ) ou encore des fragments comprenant un domaine de l'anticorps initial reconnaissant le polypeptide ou le fragment de polypeptide cible selon l'invention.
- 10 L'anticorps peut être obtenu par la technique des hybridomes bien connu de l'homme du métier. Cette technique des hybridomes consisterait dans ce cas à réaliser une fusion entre des cellules productrices d'anticorps dirigés contre une séquence polypeptidique déduite de tout ou partie de la SEQ ID N°1 avec une cellule myélomateuse.
- 15 Un anticorps selon l'invention pourra être facilement détectable et pourra donc comprendre en outre un marqueur détectable isotopique ou non isotopique, par exemple fluorescent, ou encore être couplé à une molécule telle que la biotine, selon des techniques bien connues de l'homme du métier.
- 20 Cet anticorps peut servir pour la mise en œuvre de la détection dans un échantillon d'une présence de tout ou partie d'un polypeptide issu de l'expression d'un gène codant pour un canal potassique. Dans ce but, cet anticorps est placé dans l'échantillon et l'expression du gène dont on cherche à modifier l'expression est détectée par la présence d'un complexe antigène
- 25 anticorps.
- Le gène pour lequel on cherche à détecter la présence du polypeptide correspondant code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1.
- 30 L'invention est enfin relative à un kit de détection de tout ou partie du polypeptide précédemment décrit dans un échantillon contenant un mélange de polypeptides, caractérisé en ce qu'il comprend
- un anticorps précédemment décrit, l'anticorps étant détectable par des techniques de marquage de l'anticorps bien connues de l'homme du métier.

*Figures*

- Figure 1 : Une représentation schématique d'un canal potassique codé par le gène VvSOR de *Vitis vinifera* ;
- Figure 2 : Gel d'une migration électrophorétique de produits d'amplification par RT-PCR quantitative de l'ARNm produit par le gène VvSOR dans des cellules ou tissus prélevés à différents endroits d'une plante transformée (PT) ou d'une plante non transformée (PNT) ;
- Figure 3 : Une représentation graphique de quantité d'ARNm VvSOR produit par des baies de raisins de *Vitis vinifera* au cours de la croissance de telles baies. La référence temps est le stade "véraison", qui sépare les deux phases de croissance C1 et C2,
- Figure 4 : Une première photographie représentative de grappes de raisins au stade véraison issues de plantes non transformée et une deuxième photographie représentative de grappes de raisins au stade véraison issues de plantes transformées; et
- Figure 5: Une représentation graphique des quantités accumulées d'acide tartrique et d'acide malique, d'une part dans les baies récoltées à maturité sur des plantes non transformées (contrôle) et d'autre part dans des baies récoltées à maturité sur des plantes transformées surexprimant le gène VvSOR (surexprimeur).

*Exemples***Exemple de mise en œuvre du procédé d'obtention de cellules transformées et vérification**

Pour obtenir une plante transformée, on modifie une expression du gène VvSOR (ou SEQ ID N°1) qui consiste à réaliser une transgénèse. Pour réaliser cette transgénèse, on transforme une cellule embryogénique avec un vecteur recombinant qui comporte une copie supplémentaire du gène d'intérêt cellulaire. Puis on vérifie que la transgénèse a bien été réalisée en mesurant l'expression du gène cellulaire et du gène étranger.

**- Matériels et méthodes**

La plante ainsi que les techniques utilisées pour réaliser les analyses génomiques ont été décrites par Pratelli, R., et al., 2002, Plant Physiology

128, 564-577.

*Criblage d'une banque d'ADNc de Vitis Vinifera*

On réalise un criblage d'une banque d'ADNc de baies de *Vitis vinifera* pour  
5 identifier la SEQ ID N°1, avec deux sondes préparées à partir d'ADNc  
d'*Arabidopsis thaliana* (ADNc *AtSKOR* et ADNc *AtKCO1*), chacun de ces  
ADNc codant pour un canal sortant rectifiant de potassium de type Shaker.  
Le criblage a été réalisé selon une technique bien connue de l'homme du  
10 métier (Fillion, L., Ageorges, A., Picaud, S., Coutos-Thévenot, P., Lemoine,  
R., Romieu, C. and Delrot, S. (1999) *Plant Physiology* 120, 1083-1093 ;  
Gaymard, F. et al. (1998) *Cell* 94, 647-655 ; Czempinski, K., Zimmermann,  
S., Ehrhardt, T. and Müller-Röber, B. (1997) *The EMBO Journal* 16, 2565-  
2775 ; Church, G.W. and Gilbert, W. (1984) *Proceedings of the National*  
15 *Academy of Sciences of the United States of America* 81, 1991-1995).

*Transformation de la baie*

Pour transformer la vigne *Vitis Vinifera*, on réalise une transgénèse qui  
a pour but d'augmenter l'expression du gène obtenu après criblage de la  
banque d'ADNc de cellules de baies de *Vitis vinifera*. On prépare des cellules  
20 embryogéniques de *Vitis vinifera* en vue de les transformer avec l'ADNc (ou  
SEQ ID N°1) codant pour un canal potassique de *Vitis vinifera* et obtenu  
après criblage de la banque d'ADNc juste ci-dessus décrite.

Cette transformation vise spécifiquement à transférer au moins une copie  
supplémentaire de l'ADNc ou SEQ ID N°1 dans le cytoplasme de la cellule et  
25 à l'intégrer dans l'ADN nucléaire de la cellule hôte. On prépare parallèlement  
un vecteur comme décrit par Torregrosa, L. (1998, *Vitis* 37 ,91-92) en vue  
d'obtenir un futur vecteur recombinant comportant la séquence nucléotidique  
isolée par criblage de la banque.

30 *Amplification de l'ADNc VvSOR*

Pour amplifier l'ADNc, on réalise une RNA-PCR et une semi-quantitative  
RNA-PCR (Pratelli, R., Lacombe, B., Torregrosa, L., Gaymard, F., Romieu,  
C., Thibaud, J.B. and Sentenac, H. (2002) *Plant Physiology* 128, 564-577).  
Les amorces spécifiques pour *VvSOR* sont l'amorce *SOR* avant ou SEQ ID  
35 N°2 et l'amorce *SOR* arrière ou SEQ ID N°3. Cette RNA-PCR s'effectue à

partir d'ARNm issus de cellules d'une plante transformée (PT) et à partir de cellules issues d'une plante non transformées (PNT). Les ARN ont été prélevés à différents endroits de la plante transformée (PT) et à différents endroits de la plante non transformée (PNT), figure 2. Notamment, pour

5 chacune des plantes PT et PNT, on a prélevé des ARN à partir de cellules de queue du fruit (S), de cellules de racine (R ), de cellules de la tige (St), de cellules de feuilles (L), de cellules de baies verte (GB), de cellule de baies au moment de la véraison (BV), et de cellules de baies mature (MB).

10 *Quantifications*

On isole les ARNm et les protéines des échantillons prélevés sur des plantes transformées et des plantes non transformées. Puis on quantifie par les techniques d'hybridation moléculaire (Northern Blot), Reverse-PCR quantitative et Western Blot la quantité d'ARNm et de protéines issues de

15 l'expression du gène SEQ ID N°1.

*Etude électrophysiologique du canal codé par le gène isolé après criblage de la banque d'ADNc de baies de raisins de Vitis vinifera dans un ovocyte de Xénope*

20 L'ADNc qui a été isolé après criblage de la banque est cloné dans un vecteur, et un tel vecteur recombinant est ensuite injecté dans un ovocyte de Xénope selon une technique de "patch clamp", technique bien connue de l'homme du métier. Cette technique de "patch clamp" permet d'étudier les propriétés électrophysiologiques de canaux transmembranaires vis-à-vis de

25 certains ions.

- Résultats

*Résultat du criblage de la banque d'ADNc, figure 1*

30 Un insert de 2,4 kbp a été détecté et séquencé. Cet insert a servi à isoler le gène complet de *Vitis Vinifera* qui code pour un nouveau canal potassique sortant similaire aux canaux potassiques d'*Arabidopsis*, de type Shaker. Une longueur de cet ADNc complet est de 2,5 kbp. Cet ADNc complet est appelé *VvSOR* (*Vitis vinifera* Shaker-like Outward Rectifier).

35 Les inventeurs ont découverts que le gène *VvSOR* code une protéine

comportant 796 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 91,2 kDa. La protéine comporte une structure typique des canaux Shaker des plantes (voir figure 1). Cette protéine comporte une région N-terminale, un cœur hydrophobe composé de 6 segments transmembranaires (dénommés S1 à S6) et un pore formant un domaine (P) entre S5 et S6, une longue région C-terminale contenant un site supposé être un site de liaison de nucléotides cycliques, suivi d'un domaine ankyrine consistant en 6 domaines répétés puis d'un domaine K<sub>HA</sub> (Zimmermann, S. and Sentenac, H. (1999) *Current Opinion in Plant Biology* 2, 477-482.), riche en acides aminés hydrophobes et acides. L'ensemble des régions C et N terminales des canaux de plante de type Shaker est supposé être de localisation cytoplasmique.

Le gène VvSOR comporte 84% d'identité vis-à-vis du gène AtSKOR (Gaymard, F. et al. (1998) *Cell* 94, 647-655) et 79% vis-à-vis du gène AtGORK (Ache, P. et al. (2000) *FEBS Letters* 486, 93-98). La comparaison de la structure des gènes et de la position des introns de VvSOR, de AtSKOR et de AtGORK a montré que le gène de la Vigne *Vitis* était plus proche du gène AtGORK, en particulier parce que ces deux gènes possèdent des positions spécifiques d'introns que l'on ne retrouve pas dans le gène AtSKOR (Pilot, G., et al., 2003, *Journal of Molecular Evolution* 56, 418-434)..Le gène SOR est donc l'orthologue du gène GORK dans la vigne *Vitis vinifera*.

#### *Résultats de l'amplification, localisation de l'expression du gène VvSOR, figures 2 et 3*

Les ARNm issus de l'expression du gène SEQ ID N°1 sont présents dans les cellules de la queue du fruit (S), dans les cellules de la tige (St), dans les cellules des feuilles (L), dans les cellules de baies verte (GB), dans les cellules de baie au moment de la véraison (BV), et dans les cellules de baies mature (MB). Mais les ARN issus de l'expression du gène SEQ ID N°1 ne sont pas présentes dans les racines (R), figure 2. Les inventeurs ont donc pu montrer que l'expression du gène était remarquable dans les parties aériennes de la plante, et notamment dans les feuilles, les jeunes pousses, et les baies mais pas dans les racines.

Les ARNm issus de la plante transformée sont présents en quantité relative

plus grande que les ARNm issus de la plante non transformée (figure 2).

Les inventeurs ont également estimé la quantité d'ARNm produit au cours de la croissance des baies de raisins de la plante, figure 3. La figure 3 représente une quantité d'ARNm produit au cours du développement de la

5 baie de raisins en fonction du temps. En particulier, le développement des baies de raisins est caractérisé par une première étape de croissance C1, une étape de stagnation suivie d'une transition appelée véraison et d'une deuxième étape de croissance C2. Les inventeurs ont observé que la

10 quantité d'ARNm est à son maximum au moment de la véraison, indiquant que la détection des plantes transformées doit s'effectuer préférentiellement au moment de la véraison.

#### *Résultats de la transformation figures 2, 4 et 5*

Après migration électrophorétique des ADNc amplifiées SEQ ID N°1 codant

15 pour le canal potassique de *Vitis Vinifera* sur le gel d'électrophorèse, on n'observe la présence de l'ADNc que dans les parties aériennes et dans les baies pour les plantes transformées et les plantes non transformées (figure 2). Par contre l'ADNc n'est pas présent dans les racines. La mise en œuvre du procédé de sélection s'effectuera préférentiellement sur toutes les cellules

20 dans lesquelles on a pu détecter le gène d'intérêt.

La figure 4 présente une première photographie de grappes de baies de raisins issues de plantes non transformées et une deuxième photographie de baies de raisins de plantes transformées. Les inventeurs ont mesuré le poids de nombreux échantillons représentatifs constitués de 100 baies issues de

25 plantes transformées et de 100 baies issues de plantes non transformées. La comparaison des plantes non transformées et des plantes transformées a été faite dans deux conditions différentes.

La première de ces conditions est un cycle de fructification obtenu sous serre climatisée et éclairée et s'étant achevé par une vendange à maturité au

30 printemps.

La seconde de ces conditions est un cycle de fructification obtenu sous serre non climatisée et non éclairée et s'étant achevé par une vendange à maturité en période estivale.

Dans les deux conditions décrites ci-dessus, les inventeurs ont observé à

35 l'œil nu que la taille des baies issues de plantes transformées était plus



- élevée que la taille des baies issues de plantes non transformées. Dans la première des conditions expérimentales décrites ci-dessus, les inventeurs ont observé que la taille des baies, estimée par le poids moyen de 100 baies issues de plantes transformées est 1,3 fois plus importante que la taille des
- 5 baies issues de plantes non transformées. Dans la seconde des conditions expérimentales décrites ci-dessus, les inventeurs ont observé que la taille des baies, estimée par le poids moyen de 100 baies, issues de plantes transformées est 1,7 fois plus importante que la taille des baies issues de plantes non transformées.
- 10 Les inventeurs ont observé que la quantité d'acide malique accumulée dans les baies mûres n'est pas significativement différente chez les plantes transformées par rapport à ce qu'elle est chez les plantes non transformées (Figure 5). A l'inverse, les inventeurs ont observé que la quantité d'acide
- 15 tartrique accumulée dans les baies mûres est largement supérieure (20% au moins) chez les plantes transformées par rapport à ce qu'elle est chez les plantes non transformées (Figure 5).

*Résultat de l'étude électrophysiologique en ovocyte de Xénope*

- Les inventeurs ont découvert que la protéine codée par VvSOR était un
- 20 canal potassique autorisant un flux d'ions potassiques sortant de la cellule. Ce canal est préférentiellement perméable à l'ion potassium. Ce canal est bloqué par des inhibiteurs similaires à ceux utilisés pour bloquer les canaux potassiques codés par les gènes AtSKOR et AtGORK de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.
- 25 Le canal potassique codé par le gène VvSOR est dépendant de la concentration en potassium externe et interne. Une diminution de la concentration externe de potassium entraîne une diminution du courant potassique sortant. Ce canal est aussi dépendant du pH interne et externe à la cellule. En effet, une diminution du pH externe ou interne entraîne une
- 30 forte diminution du courant potassique sortant.

**Exemple de mise en œuvre du procédé de sélection de la plante :  
détection moléculaire, par mesure de la quantité de protéines produite  
ou par la quantité d'ARNm produit.**

- 35 Après transformation des cellules de baies de raisins, on broie les cellules de

- baies de raisins de manière à extraire les ARNm et les protéines aux moments particulièrement propices pour détecter une quantité optimale. Puis on quantifie la quantité d'ARNm *VvSOR* produit par le gène de *Vitis vinifera* *VvSOR* par Reverse-PCR quantitative ou hybridation moléculaire (Northern blot), et la quantité de protéines provenant de la traduction de cet ARNm par immunodétection (technique de Western blot). Chacune de ces quantités est comparée à une quantité d'ARNm de référence et à une quantité de protéines de référence qui correspondent respectivement à une quantité d'ARNm et de protéines normalement présentes dans les cellules de plantes non transformées.
- On choisit un moment où on a le plus de chance de trouver en grande quantité l'expression du gène à mesurer. Notamment, pour mesurer la quantité d'ARNm, on choisit un moment dans la première phase de croissance C1 de la baie, figure 3. Pour mesurer la quantité de protéine, on choisit un moment d'une des phases de croissance C1 ou C2, préférentiellement C2 ou bien un moment après le développement de la baie.

*Références bibliographiques*

- Dutruc-Rosset, G. (2003) in: Bull. O.I.V., special issue, pp. 94 O.I.V., Paris.
- 5       - Hrazdina, G., Parsons, G.F. and Mattick, L.R. (1994) American Journal of Enology and Viticulture 35, 220-227.
- Hale, C.R. (1977) Vitis 16, 9-19.
- Véry, A.-A. and Sentenac, H. (2003) Annual Review of Plant Biology 54, 575-603.
- 10       - Pratelli, R., Lacombe, B., Torregrosa, L., Gaymard, F., Romieu, C., Thibaud, J.B. and Sentenac, H. (2002) Plant Physiology 128, 564-577.
- Fillion, L., Ageorges, A., Picaud, S., Coutos-Thévenot, P., Lemoine, R., Romieu, C. and Delrot, S. (1999) Plant Physiology 120, 1083-1093.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989), Cold Spring Harbor:.
- 15       - Gaymard, F. et al. (1998) Cell 94, 647-655.
- Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T. and Müller-Röber, B. (1997) The EMBO Journal 16, 2565-2775.
- Church, G.W. and Gilbert, W. (1984) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81, 1991-1995.
- 20       - Lacombe, B. and Thibaud, J.-B. (1998) Journal of Membrane Biology 166, 91-100.
- Lacombe, B., Pilot, G., Gaymard, F., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B. (2000) FEBS Letters 466, 351-354.
- 25       - Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B. (2000) The Plant Cell 12, 837-851.
- Zimmermann, S. and Sentenac, H. (1999) Current Opinion in Plant Biology 2, 477-482.
- Langer, K. et al. (2002) The Plant Journal 32, 997-1009.
- 30       - Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R. and Hedrich, R. (2000) FEBS Letters 486, 93-98.
- Pilot, G., Pratelli, R., Gaymard, F., Meyer, Y. and Sentenac, H. (2003) Journal of Molecular Evolution 56, 418-434.
- Decroocq, V., Fave, M.G., Hagen, L., Bordenave, L. and Decroocq, S. (2003) Theoretical and Applied Genetics 106, 912-22.
- 35

- Kanellis, A.K. and Roubelakis-Angelakis, K.A. (1993) in: Biochemistry of Fruit Ripening, pp. 189-234 (Seymour, G., Taylor, J. and Tucker, G., Eds.) Chapman Hall., London.
- Winkler, A., Cook, J., Lider, J.A. and Kliewer, W.M. (1974) University  
5 of California press, Berkeley.
- Blatt, M.R. and Gradmann, D. (1997) Journal of Membrane Biology 158, 241-256.
- Roberts, S.K. and Tester, M. (1995) The Plant Journal 8, 811-825.
- de Boer, A.H. and Wegner, L.H. (1997) Journal of Experimental  
10 Botany 48, 441-449.
- Madeja, M. (2000) News in Physiological Sciences 15, 15-19.
- Geiger, D., Becker, D., Lacombe, B. and Hedrich, R. (2002) The Plant Cell 14, 1859-68.
- Mouline, K. et al. (2002) Genes and Development 16, 339-350.
- Hosy, E. et al. (2003) Proceedings of the National Academy of  
15 Sciences of the United States of America 100, 5549-54.
- Blanke, M.M., Pring, R.J. and Baker, E.A. (1999) Journal of Plant Physiology 154, 477-481.
- Possner, D.R.E. and Kliewer, W.M. (1985) Vitis 24, 229-240.
- Coombe, B.G. (1987) American Journal of Enology and Viticulture  
20 38, 120-127.
- Torregrosa, L. (1998) Vitis 37, 91-92.
- Becker, D., Hoth, S., Ache, P., Wenkel, S., Roelfsema, M.R.G., Meyerhoff, O., Hartung, W. and Hedrich, R. (2003) FEBS Lett (in press).
- Baizabal-Aguirre, V.M., Clemens, S., Uozomi, N. and Schroeder, J.I.  
25 (1999) Journal of Membrane Biology 167, 119-125.

## REVENDICATIONS

- 1 - Procédé pour l'obtention d'une plante transformée en fonction d'un phénotype relatif à une taille et ou de la composition en acides organiques d'un organe de stockage de la plante, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape suivante :
- modifier dans les cellules de l'organe de stockage ou dans les tissus qui alimentent l'organe de stockage l'expression d'un gène codant pour un canal potassique sortant.
- 2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que
- on transforme au moins une cellule de la plante par le gène codant pour un canal potassique sortant,
  - on sélectionne la cellule transformée, et
  - on régénère une plante transformée à partir de la cellule transformée.
- 3 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que le gène dont l'expression est modifiée code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléotidique SEQ ID N°.1.
- 4 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'on surexprime le gène afin d'augmenter la taille et/ou modifier la composition en acides organiques de l'organe de stockage.
- 5 - Cellule transformée, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 4.
- 6 - Plante transformée, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 5.
- 7 - Amorce nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique codant une séquence polypeptidique ayant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de tout ou partie de l'une ou l'autre séquence nucléotidique SEQ ID N°.2 ou SEQ ID N°.3.
- 8 - Utilisation de l'amorce selon la revendication 7 pour sélectionner des plantes ou des cellules surexprimant un gène codant une séquence polypeptidique contenant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de l'une ou l'autre séquence nucléotidique

SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3.

9 - Procédé de sélection d'une plante en fonction d'un phénotype relatif à une taille des organes de stockages de ladite plante et/ou de la composition en acides organiques, caractérisé en ce qu'on mesure  
5 l'expression d'un gène codant pour un canal potassique sortant dans les cellules des organes de stockage ou dans les tissus qui alimentent les organes de stockage.

10 10 - Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le gène dont on mesure l'expression code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1.

11 - Procédé selon l'une des revendications 9 à 10, caractérisé en ce que

15 - on mesure une quantité d'ARNm issu d'une transcription du gène, ou  
- on mesure une quantité de protéines résultant de l'expression du gène.

12 - Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la mesure de la quantité d'ARNm est faite au cours d'un développement des organes de stockage et en ce que la mesure des protéines est réalisée  
20 pendant ou après le développement des organes de stockage.

13 - Cellule d'une plante, caractérisée en ce qu'elle surexprime un gène codant pour un canal potassique sortant dont une séquence polypeptidique présente au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1.

25 14 - Plante, caractérisée en ce qu'elle surexprime un gène codant pour un canal potassique sortant dont une séquence polypeptidique présente au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N°1.

15 - Utilisation d'un gène codant un canal potassique sortant pour  
30 modifier dans une plante un phénotype relatif à une taille et/ou à la composition en acides organiques d'au moins un organe de stockage.

16 - Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que le gène code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID  
35 N°1.

17 - Utilisation selon l'une des revendications 15 à 16, caractérisée en ce que

- on surexprime le gène dans des cellules de l'organe de stockage.

5 18 - Anticorps, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre tout ou partie d'un polypeptide issu de l'expression d'un gène codant un canal potassique sortant.

19 - Anticorps selon la revendication 18, caractérisé en ce que le gène code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N°1.

10 20 - Procédé de détection d'une présence de tout ou partie d'un polypeptide issu de l'expression d'un gène codant pour un canal potassique sortant dans un échantillon comportant un mélange de polypeptides, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

15 - mettre en contact l'échantillon avec un anticorps selon l'une des revendications 18 à 19, et

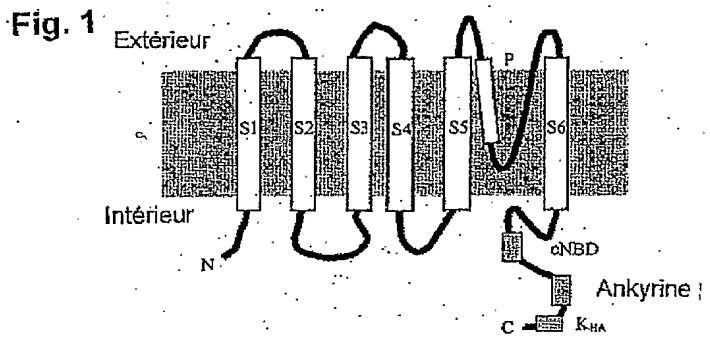
- détecter un complexe antigène/anticorps formé.

21 - Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que le gène code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N°1.

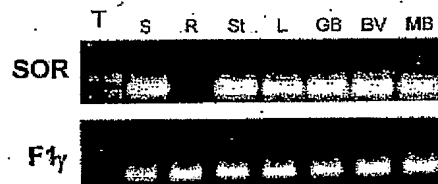
20 22 - Kit de détection de tout ou partie d'un polypeptide produit d'un gène codant un canal potassique dans un échantillon contenant un mélange de polypeptides, caractérisé en ce qu'il comprend

- un anticorps selon l'une des revendications 18 à 19.

25 23 - Kit de détection selon la revendication 22, caractérisé en ce que le gène code une séquence polypeptidique présentant au moins 40% de similarité avec une séquence polypeptidique déduite de la séquence SEQ ID N°1



**Fig. 2**



**Fig. 3**

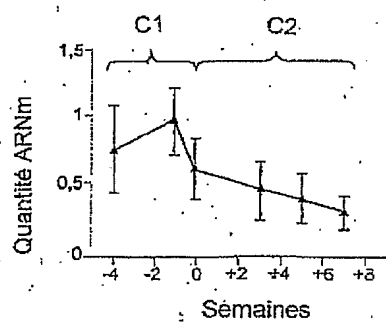
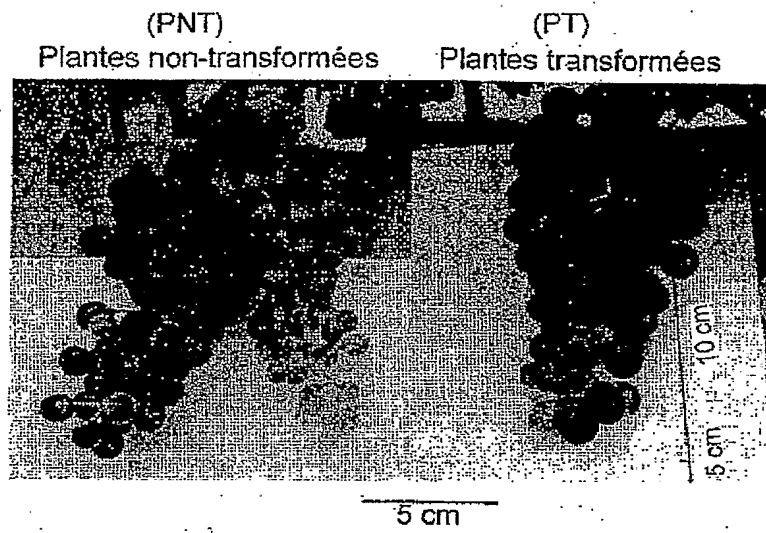




Fig. 4



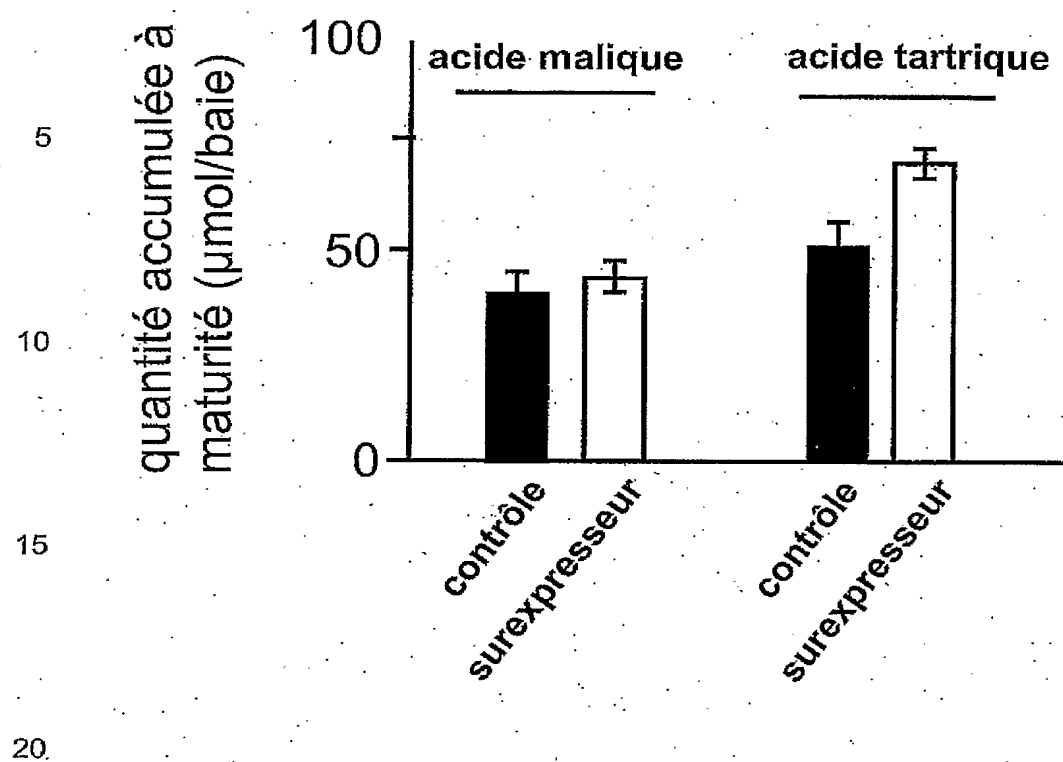


Figure 5:

## Listing sequence

<110> : Institut National de la Recherche Agronomique (I.N.R.A.)  
 <120> : Utilisation de gènes codant pour des canaux potassiques sortants pour modifier un phénotype relatif à une taille d'au moins un organe de stockage d'une plante et à la teneur de cet organe en acides organiques.

<130> : 11302 WO

<140> : PCT

<141> :

<150> : FR 0450199

<151> : 03/02/2004

<170> : PatentIn version 3.1

<160> : 3

<212> : DNA/RNA

<211> : 2376

Nom de la séquence : SEQ ID N°1 ou VvSOR

<213> : Vitis vinifera

<400> : SEQ ID NO : 1

atgtcgtttt	cttgtgcaaa	agccttcttc	caacggtttt	gtgttgaaga	gttccaaatg	60
gagagaacta	gcctagggtc	cgtcttctct	agtcactctc	tcccatctct	tggggccaga	120
atcaaccagg	caacaaagct	tcaaaaaacac	ataatttctc	ctttcagtc	ccgttacagg	180
gcttgggaaa	tggtgctgat	tattctggtc	atctactctg	cctggatctg	cccatttgag	240
tttggatttc	tgccctacaa	gcaagacg	cttttcatct	tcgataacat	tgtcaatggc	300
ttcttcgcca	tcgatatcgt	tctcactttc	tttgtagcat	acctcgacac	agaaacttat	360
cttcttggtg	atgatgccaa	gaaaattgca	atcagggtaca	tatctacctg	gtttatcttc	420
gatgtctgtt	cgacagcgcc	atltgaagct	ttcagcctcc	tgttcacaaa	gcataacagt	480
ggactcggct	ataaagcact	caacatgctc	aggctctggc	gactgagacg	agtcagctcc	540
ctgtttgcaa	gactagagaa	ggacatccgg	tttaactact	tctggattcg	atgcataaaa	600
ctcacttctg	taactctggt	tgacgtacac	tgtgctggat	gctttaacta	tctgattgca	660
gatagatacc	cggatccaga	acgaacctgg	attggtgcag	tctatccaaa	tttcaaagaa	720
gagaacctct	gggacagata	tgtaacttca	atttactggt	ctattactac	actaactact	780
actggttatg	gagacttgca	tgctgagaac	ccaagagaga	tgctggttga	tattttttac	840
atgctattca	acttgggatt	aacatcttac	ctcattggga	acatgaccaa	tcttgttggt	900
cactggacca	gccggaccag	agatttttagg	gatacagtca	ggtctgcttc	agagtttgca	960
acaaggaatc	aattgcccc	acgcattcag	gatcagatgc	tgctgcactt	atgtctcaag	1020
ttcaaaaacag	aaggattgaa	acaacaagac	actttgaatg	gcctgccaag	agccattcgc	1080
tccagcattg	cacactacct	cttcttccct	atcgctcaaa	atgtctatct	tttccagggt	1140
gtttctcagg	acttcttttt	ccaactgggt	tctgaagtgg	aggctgagta	tttcccacct	1200
agagaagatg	tgattctaca	gaaggaggct	tcaacagata	tatatattct	tgtctcggga	1260
gcggtggatt	tgatagcata	tattgacgga	catgatcaga	ttctcggaaa	ggctggtgca	1320
ggggatgtgt	ttggagagat	tggggtttta	tggttataggc	cacaatcggt	aacagtccgg	1380
acctctgagc	tttctcagat	actaagatta	agcagaactt	cactgatgaa	cgcaatccaa	1440
gcaaatatgg	aagatggacc	aattattatg	aacctctttt	tcaagaaaact	gaaagggcta	1500
gaaagctcag	gctttacaga	cccacatatg	gacccagatt	ccatcctcag	agaatggatt	1560
gatggagtac	caccaggagg	aagcctttcc	catgctggat	gtcatgatca	atcaccacat	1620
ggagatccat	caatacaaga	agcaagggac	ataggtttac	tgggatcaga	agctacaaaag	1680
aagagtaaaag	cagacaaaagc	tcatgagtcg	actggatg	ggatcgatgc	aaattcagca	1740
gctgaggatg	gccaaaacggc	tcttcatggt	gctgtctgca	acgggcatct	tgaaatgggt	1800
agaattctgc	tagaaagagg	agcaaatgtg	aacaaaaagg	atgctagagg	gtggacccca	1860
aaagctttag	cggaacaaga	aggaaaaaaa	agcatatatg	acctcttact	aagttatgaa	1920
aatagaaggt	tattagatga	acacaaaatt	catttttattg	ggtcagacgc	agctgactgt	1980
tgtactagtc	aaggtctaca	tacaagaacg	ggggggccca	attttcacaa	ctctcaattt	2040
aaaaaggtat	ccacaaattc	caattcaggc	agtcctagcc	ctcccggcaa	caaagatggt	2100
atgacattga	ccaagaggag	agtcactatc	cacagacagt	ttcaaaatgc	aagtacatca	2160
caggggcacg	ttgggaaggt	gattattcta	cctgattcaa	tagaagagct	actgcaaaatt	2220
gctggtcaca	agtttgagg	ctacaatccc	accaaagtcg	ttagtgcagg	gaatgcagaa	2280
atagatgaca	taagcgttat	ccgagatggg	gatcatctgt	ttctacttca	aaatgagaat	2340
ggaactacaa	ttacaatggt	acctaattggt	tactga			2376

<212> : RNA

<211> : 28

Nom de la séquence : amorce spécifique avant ou SEQ ID N°2

<213> : Vitis Vinifera

<400> : SEQ ID NO 2

gcaaagttgc ttttaggaaa gccggggc

28

<212> : RNA

<211> : 27

Nom de la séquence : amorce spécifique arrière ou SEQ ID N°3

<213> : Vitis Vinefera

<400> : SEQ ID NO 3

ttcacataac aaatatagct tctgacc

27